



GUTMANN - PLASSERAUD SA

BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

14 AVR. 2000

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

03.09.1997

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

7587 12368

3 oct. 97

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen



demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

B3674 - PB

01-44-51-18-00

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCÉDE DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS RAMIFIÉS AU MOYEN
DE PLANTES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

TOTAL RAFFINAGE DISTRIBUTION S.A.

Forme juridique

société anonyme

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

TOUR TOTAL
24, cours Michelet
92800 PUTEAUX

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.
BECKER Philippe CPI 97-0800

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

B3674 - PB

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 12368

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS RAMIFIES AU MOYEN DE PLANTES
GENETIQUEMENT MODIFIEES

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.

3, rue Chauveau-Lagarde

75008 PARIS (FRANCE)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1) DUHOT Pierre
19, rue de l'Avenir
76430 Saint-Romain de Colbosc (France)
- 2) GONTIER Eric
Appartement 601, Résidence Roses et Mouettes
56, rue du Docteur Louis Michel - 54000 NANCY (FRANCE)
- 3) THOMAS Daniel
Domaine de Rimberlieu, 133 Allée de l'Etang - 60150 VILLERS-SUR-COUDUN
(FRANCE)
- 4) THOMASSET Brigitte
10, rue Jules Méline - 60200 COMPIEGNE (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 4 février 1998

BECKER Philippe CPI 97-0800

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
26			X	07/01/98	13 JAN. 1998 - SF

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

INTRODUCTION

La présente invention concerne un procédé de production d'acides gras. Elle concerne plus particulièrement un procédé de production d'acides gras à chaîne aliphatique non linéaire. Le procédé de l'invention réside plus particulièrement dans l'utilisation de plantes modifiées génétiquement. Les acides gras ainsi produits, sous forme libre ou non, éventuellement modifiés par voie chimique ou enzymatique, peuvent être utilisés dans la fabrication de différents produits industriels, notamment de lubrifiants de type huile hydraulique ou huile moteur.

Les acides gras sont des acides à chaîne aliphatique longue généralement comprise entre 6 et 25 atomes de carbone. La chaîne aliphatique peut être linéaire ou non linéaire (également désignée ramifiée). Les acides gras produits naturellement se présentent soit sous forme libre, soit sous forme estérifiée, notamment sous forme de diglycérides ou triglycérides. Les acides gras sont généralement utilisés dans différents types d'industries, notamment pour la préparation de bases lubrifiantes d'origine naturelles ou dans des détergents, adjuvants, ou encore dans la constitution de biocarburants. Pour toutes ces applications, il est particulièrement avantageux de pouvoir utiliser des acides gras d'origine naturelle, notamment dérivés de matière végétale. Ainsi, différents procédés de production et d'extraction d'acides gras à partir de plantes (notamment de graines de plantes) ont été décrit dans l'art antérieur (voir notamment Harrington et al, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 1985, Vol. 24, page 314; FR 2 722 798). Par ailleurs, la demande WO 94/13814 est relative à des cellules de plantes génétiquement modifiées par une enzyme impliquée dans le transfert des acides gras libres sur le cholestérol. Néanmoins, si cette demande permet de modifier la composition des triglycérides, elle ne permet nullement d'altérer la structure de la chaîne aliphatique des acides gras.

L'un des inconvénients majeurs des procédés antérieurs utilisant des plantes, réside précisément dans la faible diversité des acides gras que l'on peut obtenir. Ainsi, les plantes produisent naturellement essentiellement des acides

gras à chaîne aliphatique linéaire de type C6 à C24. Or, les études réalisées par la Société demanderesse ont montré que pour obtenir une bonne base lubrifiante, il était particulièrement avantageux d'utiliser des acides gras à chaîne aliphatique non linéaire (ou ramifiée). Ainsi, la Demanderesse a montré que
5 l'emploi d'acides gras (libres ou non) à chaîne aliphatique ramifiée, permettait d'obtenir des produits de type lubrifiant présentant une bonne stabilité thermique, une bonne résistance à l'oxydation, une bonne viscosité, une bonne biodégradabilité ainsi que des points de fusion bas.

Il existe donc un réel besoin de disposer de procédés permettant de
10 produire efficacement des acides gras ramifiés. La présente invention apporte justement une solution avantageuse à ces besoins en décrivant des procédés basés sur la modification génétique de plantes.

Ainsi, un premier aspect de l'invention concerne un procédé de production d'acides gras ramifiés au moyen de plantes génétiquement modifiées.

15 Un autre aspect de l'invention réside dans des plantes génétiquement modifiées capables de produire des acides gras ramifiés et dans un procédé de préparation de telles plantes. Un autre aspect de l'invention réside également dans des cellules de plantes contenant un acide nucléique recombinant codant pour un produit induisant ou stimulant la synthèse dans ladite cellule d'acides
20 gras ramifiés.

La présente invention est également relative à l'acide nucléique recombinant tel que défini ci-dessus et à tout vecteur le comportant.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION.

25 La présente invention est donc relative à un procédé de production d'acides gras ramifiés à partir de plantes génétiquement modifiées, à des plantes et cellules de plantes génétiquement modifiées produisant des acides gras ramifiés, ainsi qu'à des acides nucléiques recombinants et des vecteurs les contenant, utilisables à cet effet.

30 Au sens de l'invention, on entend par acide gras ramifié, tout acide gras possédant une chaîne aliphatique ramifiée. Il s'agit préférentiellement d'un acide

gras possédant une chaîne aliphatique en C6 à C24, encore plus préférentiellement en C12 à C24. Des exemples de tels acides, essentiellement sous forme saturée et non encore ramifiée sont notamment l'acide caprique (C10), le laurique (C12), le myristique (C14), le palmitique (C16), le stéarique (C18), l'écicosanoïque (C20), le docosanoïque (C22), le tétracosanoïque (C24) et des mélanges de ceux-ci. La chaîne aliphatique des acides gras ramifiés de l'invention peut être ramifiée en une ou plusieurs positions par différents groupements. Avantageusement, la chaîne aliphatique comporte une à quatre ramifications localisées dans la partie centrale de la chaîne aliphatique et/ou dans sa partie terminale opposée à la fonction acide. Plus préférentiellement, la ou les ramifications sont localisées sur un ou plusieurs carbone compris entre les positions 8 et 15 de la chaîne aliphatique. Par ailleurs, le groupement ramifié peut être tout groupe alkyl, de préférence un alkyl en C1 à C5, encore plus préférentiellement un méthyle, éthyle, propyl, isopropyl, butyle, terbutyl. Un groupement ramifié particulièrement préféré est un groupement méthyle. Des acides gras particuliers au sens de l'invention sont par exemple l'acide méthyl 9 octadécanoïque ; l'acide méthyl 10 octadécanoïque ; l'acide diméthyl 9,12 octadécanoïque ; l'acide diméthyl 10,12 octadécanoïque ; l'acide diméthyl 9,13 octadécanoïque ; l'acide diméthyl 10,13 octadécanoïque ; l'acide diméthyl 9,12 oléique ; l'acide diméthyl 10,12 oléique ; l'acide diméthyl 9,13 oléique ; l'acide diméthyl 10,13 oléique ou encore l'acide 2, 4, 6, 8-tétraméthyldécanoïque.

Par ailleurs, les acides gras ramifiés selon l'invention peuvent être des acides gras ramifiés sous forme libre ou sous forme de dérivés. Il peut s'agir notamment d'esters d'acide gras ramifié, tels que des monoesters, diesters ou triesters du glycérol (triglycéride). Dans le cas de di- ou triglycérides, il n'est par ailleurs pas nécessaire que la totalité des acides gras présents dans la molécule soit ramifiée. Ainsi, un triglycéride peut comporter 1, 2 ou 3 acides gras ramifiés. Il est toutefois préférable que la proportion d'acides gras ramifiés dans les esters ou autres dérivés soit élevée.

On désigne au sens de l'invention par "acide nucléique recombinant", tout acide ribonucléique ou désoxyribonucléique construit par les techniques du génie génétique. Il peut s'agir en particulier d'un ADN complémentaire, d'un ADN génomique ou d'un ARN messager. Un tel acide nucléique peut par ailleurs être d'origines variées, notamment bactérienne, virale, végétale, mammifère, synthétique ou semi-synthétique. Un acide nucléique recombinant peut être préparé en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques d'acides nucléiques avec des sondes appropriées, par synthèse chimique (en utilisant des synthétiseurs d'acides nucléiques), par digestions/ligatures enzymatiques, etc. ou toute combinaison de ces méthodes.

Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans une cellule de plante comprenant un acide nucléique recombinant codant pour un produit induisant ou stimulant dans ladite cellule la synthèse d'acide(s) gras ramifié(s).

La cellule de plante selon l'invention peut être toute cellule de plante. Il peut s'agir plus préférentiellement d'une cellule de plante cultivable, et capable de régénérer une plante. Avantageusement, il s'agit d'une cellule de plante oléagineuse, telle que par exemple le colza, le tournesol, l'arachide, le soja ou encore le maïs. Il peut également s'agir d'une cellule de plante de type tabac.

La cellule selon l'invention est donc génétiquement modifiée, de sorte qu'elle comprend dans son génome sous forme libre ou intégrée, un acide nucléique recombinant codant pour un produit induisant ou stimulant la synthèse d'acide gras ramifié. Les cellules de plantes de l'invention comportent donc des acides gras dont une fraction est constituée d'acides gras ramifiés. Selon les applications envisagées, il peut être avantageux que cette fraction représente une proportion substantielle des acides gras totaux. Avantageusement, l'acide nucléique recombinant est présent dans la cellule sous forme intégrée au génome de ladite cellule, de manière à être plus stable ségrégationnellement.

Un produit est désigné comme induisant la synthèse d'acide gras ramifié lorsqu'il permet à la cellule de plante le contenant d'effectuer une synthèse



qu'elle n'aurait pu réaliser en son absence. On parle d'un produit stimulant la synthèse d'acide gras ramifié, lorsqu'il s'agit d'un produit qui permet à la cellule de plante le contenant de favoriser une voie de synthèse préexistante dans ladite cellule mais non ou peu exploitée par celle-ci, par exemple pour des
5 raisons de stoechiométrie, ou de spécificité de substrat. L'acide nucléique recombinant utilisé dans la présente invention, peut coder plus particulièrement, pour un produit capable d'induire une ramification des acides gras produits par la cellule post-synthèse ou pour un produit permettant d'effectuer une ramification concomitante à ladite synthèse. Ces deux approches sont par
10 ailleurs combinables.

Les acides gras sont synthétisés par les cellules de plantes dans le chloroplaste. Cette synthèse comprend plusieurs cycles répétitifs au cours desquels des unités carbonées sont ajoutées successivement les unes aux autres pour générer la chaîne aliphatique grasse. Après leur synthèse, ces
15 acides gras linéaires sont exportés vers le cytoplasme où ils subissent différentes modifications post-synthèse (ou post-élongation) et notamment une désaturation par des enzymes désignés désaturases.

Dans un premier mode de réalisation, l'acide nucléique recombinant code pour un produit permettant d'induire ou de stimuler la ramification post-synthèse des acides gras produits par ladite cellule de plante. Plus particulièrement, selon
20 ce premier mode de réalisation de l'invention, l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme permettant le transfert d'un ou plusieurs groupements alkyl sur la ou les doubles liaisons des acides gras insaturés.

Les groupements alkyl transférés peuvent être, comme indiqué ci-avant, tout groupement alkyl comportant de 1 à 5 atomes de carbone
25 préférentiellement. Il s'agit avantageusement de groupements alkyl comprenant de 1 à 3 atomes de carbone et notamment de groupement méthyle, éthyle, propyl ou isopropyl.

Avantageusement, l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme
30 hétérologue, c'est-à-dire une enzyme issue d'un organisme autre qu'une cellule de plante. Plus particulièrement, l'enzyme utilisée provient avantageusement

d'un microorganisme procaryote ou eucaryote telle que par exemple une bactérie ou un levure.

On peut citer à titre illustratif des acides nucléiques recombinants selon l'invention d'un acide nucléique recombinant codant pour la cyclopropane fatty
5 acide synthase encore désignée CFAS. L'acide nucléique peut également coder pour des méthyl transférase tel que par exemple des SAM-méthyl transférase c'est-à-dire des enzymes capables de catalyser le transfert d'un groupement méthyle depuis la SAM (S-Adénosyl-Méthionine) vers un acide gras insaturé ou plus généralement vers une double liaison d'une chaîne aliphatique. Un acide
10 nucléique recombinant particulier au sens de l'invention code par exemple pour la cyclopropane fatty acide synthase telle que décrite par Wang et al (Biochemistry 31 (1992) 11020) ou pour toute enzyme analogue à cette dernière. On entend au sens de la présente invention par le terme "analogue" toute enzyme possédant une ou plusieurs modifications structurales par rapport à
15 l'enzyme décrite ci-avant et conservant une activité de transfert de groupement alkyl sur les doubles liaisons de chaîne aliphatique. Ces modifications structurales peuvent être des mutations, des délétions, des substitutions ou des additions d'un ou plusieurs acides aminés. Le terme "analogue" comprend également les séquences homologues obtenues à partir d'autres organismes. Un
20 autre "analogue" est une enzyme produite par un acide nucléique hybridant avec tout ou partie de la séquence de la transférase ou la synthase et conservant une activité de même nature. L'hybridation est avantageusement réalisée dans des conditions de stringence normale, ou plus préférentiellement forte. Des conditions d'hybridation stringentes sont par exemple : Hybridation à 42°C, 50%
25 formamide, 5 X SSC, 1 X Denhardt ; Lavage à 65°C en 0,1 X SSC, 0,1% SDS. Des conditions d'hybridation non-stringentes sont par exemple : Hybridation à 37°C, 40% formamide, 5 X SSC, 1 X Denhardt ; Lavage à 50°C en 1 X SSC, 0,1% SDS. Les conditions stringentes sont particulièrement adaptées lorsque l'acide nucléique test est présent en faibles quantités et/ou sous forme peu
30 purifiée. Les conditions non stringentes sont plus adaptées lorsque l'acide nucléique test est présent en quantités plus importantes et se trouve sous forme

significativement représentée dans l'échantillon. D'autres conditions d'hybridation sont bien connues de l'homme du métier (voir notamment Maniatis et al).

5 Par ailleurs, ce mode de réalisation consistant à transférer un groupement alkyl sur une chaîne aliphatique fait appel aux groupements alkyl ou donneurs d'alkyl présents dans ladite cellule. A cet égard, pour le transfert d'un groupement méthyl, les réserves de la cellules sont principalement constituées par le groupement SAM. Aussi, dans le but d'améliorer encore l'efficacité de
10 cette réaction, et donc le rendement en acides gras ramifiés, un mode de réalisation particulier consiste à introduire dans la cellule de plante, en plus de l'acide nucléique codant pour le produit défini ci-dessus, un second acide nucléique codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse du donneur d'alkyl. Préférentiellement, il s'agit d'un acide nucléique codant pour une enzyme
15 de synthèse du SAM. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'un acide nucléique codant pour la SAM synthétase ou un analogue de celle-ci. Cet acide nucléique peut être introduit par l'intermédiaire d'un second acide nucléique recombinant, de manière simultanée avec le premier ou séquentiellement. Selon un autre mode de mise en oeuvre, les acides nucléiques codant pour les deux
20 enzymes sont portés par le même acide nucléique recombinant.

Selon un deuxième mode de réalisation de la présente invention, l'acide nucléique recombinant contenu dans la cellule de plante, code pour un produit permettant d'induire ou de stimuler l'incorporation dans la chaîne aliphatique
25 d'acide gras en cours d'élongation, de groupements générant une ou des ramifications. Selon cette deuxième approche, il ne s'agit donc pas d'effectuer une modification post-synthèse sur les acides gras produits mais d'effectuer une ramification de manière concomitante à ladite synthèse.

Ce mode de réalisation est préférentiellement obtenu en forçant la cellule
30 de plante à utiliser, comme substrat pour la synthèse de la chaîne aliphatique, un groupement Acyl-CoA comportant un nombre d'atomes de carbone supérieur

à 3, de préférence entre 4 et 8 à la place du malonyl CoA. Avantageusement, le substrat utilisé est un groupement Acyl-CoA non linéaire. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'un groupement Acyl-CoA non linéaire permettant l'incorporation dans la chaîne aliphatique en cours d'élongation d'un groupement

5 à nombre impair d'atomes de carbone. Cette stratégie permet par exemple d'obtenir des acides gras ramifiés dits multibranchés, tels que par exemple l'acide 2, 4, 6, 8-tétraméthyldécanoïque. Un exemple particulier de substrat de type Acyl-CoA est par exemple le méthylmalonyl CoA. Le méthylmalonyl CoA est un groupement non linéaire, comportant 4 atomes de carbone, dont trois servent

10 à l'élongation. Dans ce cas, dans le but de forcer la plante à utiliser ce substrat pour la synthèse de la chaîne aliphatique, il est particulièrement avantageux d'introduire dans la cellule de la plante un acide nucléique recombinant codant pour une malonyl CoA décarboxylase (E.C. N° 4.1.1.9). Le mode d'action de cette enzyme ainsi que de manière plus générale la voie de synthèse des acides

15 gras ramifiés par les cellules modifiées selon cette stratégie est représenté sur la figure 1. Il est entendu que tout autre enzyme analogue à celle mentionnée ci-dessus et capable de forcer la plante à utiliser un acyl-CoA comportant plus de 3 atomes de carbone, de préférence 4 à 8, comme substrat dans la synthèse des chaînes aliphatiques des acides gras, peut être utilisée dans la présente

20 invention. A titre d'exemple particulier de telles enzymes, on peut citer notamment la malonyl CoA décarboxylase dont la séquence nucléotidique a été décrite dans la littérature (Cf les exemples), ainsi que tout analogue de celle-ci.

Ce deuxième mode de réalisation peut également être obtenu en modifiant la spécificité des enzymes impliquées dans la synthèse de la chaîne

25 aliphatique grasse, notamment en modifiant la spécificité de l'enzyme qui empêche le transfert du malonyl CoA sur le malonyl ACP, et en particulier la spécificité de tout ou partie de la Fatty Acid Synthase, de l'acétyl CoA carboxylase ou de l'acétyl CoA transacylase. A cet égard, la Fatty Acid Synthase est constituée d'un complexe multi-enzymatique et la modification de sa

30 spécificité peut être obtenue par modification d'une, plusieurs, voire toutes les sous-unités.

Par ailleurs, comme indiqué ci-avant, ces deux modes de réalisation peuvent être combinés pour générer des cellules de plantes capables de synthétiser des acides gras à chaîne aliphatique ramifiée à la fois au stade de l'élongation et post-élongation.

5 Pour la mise en oeuvre de la présente invention, l'acide nucléique recombinant comporte avantageusement des régions régulatrices, de type promoteur, fonctionnelles dans les cellules de plantes et permettant de contrôler l'expression des acides nucléiques définis ci-dessus. Parmi les régions régulatrices de la transcription utilisables dans les plantes et dans la mise en
10 oeuvre de la présente invention, on peut citer par exemple, les régions associées au virus de la mosaïque du chou-fleur (35S, 19S) ou les régions promotrices de gènes structuraux tels que les gènes de la nopaline synthase (nos) ou l'octopine synthase (ocp) ou la mannopine, l'agropine ou l'acyl carrier protein (ACP). La structure et le clonage de ces différentes régions ont été
15 décrites dans la littérature. De manière plus générale, tout promoteur permettant une expression constitutive, spatiale ou temporelle d'un acide nucléique dans une cellule de plante peut être utilisé pour la mise en oeuvre de la présente invention. A cet égard, il est possible notamment d'utiliser des promoteurs permettant une expression localisée à certains tissus ou parties de la plante
20 (graine, pollen, etc.), ou des promoteurs dont l'activité dépend du stade de développement de la plante (élongation, floraison, etc.). Comme promoteur ayant une expression majoritaire dans les graines on peut citer par exemple le promoteur de l'ACP, de la napine ou les promoteurs décrits par Krebbers et al. (Plant Physiol. 87 (1988) 859). L'emploi de tels promoteurs peut éviter tout effet
25 secondaire potentiel induit par une production massive et généralisée d'acides gras ramifiés sur la plante, et également faciliter la récupération des acides gras ainsi produits, en les concentrant dans certaines régions de la plante.

Par ailleurs, il est également avantageux d'introduire dans les acides nucléiques recombinants selon l'invention, des séquences terminatrices
30 localisées en 3' qui peuvent dériver soit directement du gène utilisé ou provenir de régions d'autres gènes, tels que ceux notamment de la nopaline synthase

(nos) ou encore de l'octopine synthase (ocp) de la mannopine, de l'agropine ou de l'ACP.

L'acide nucléique recombinant qui comporte donc avantageusement une région régulatrice de la transcription, un gène ou une région codant pour un produit actif tel que défini ci-avant, et des régions terminatrices en 3', est
5 avantageusement introduit dans un vecteur plasmidique de clonage ou d'expression.

Un autre objet de l'invention concerne plus particulièrement un acide nucléique recombinant comprenant

- 10 - un acide nucléique codant pour un produit tel que défini ci-avant,
- un promoteur contrôlant l'expression dudit acide nucléique dans une cellule de plante, et,
- une région 3' de terminaison de la transcription.

15 Les acides nucléiques recombinants de l'invention peuvent par ailleurs comporter des signaux d'adressage, permettant d'améliorer l'adressage des protéines synthétisées vers les compartiments cellulaires où elles exercent leur activité. Lorsque le produit synthétisé est un produit impliqué dans le transfert de groupements alkyl sur des chaînes grasses post-élongation, la protéine exerce
20 son activité dans le cytoplasme et ne nécessite donc pas de signaux d'adressage particuliers. Lorsque le produit intervient sur la synthèse même des chaînes grasses, il exerce son activité au sein des chloroplastes et il peut être avantageux d'utiliser un signal permettant l'adressage de ce produit dans le chloroplaste. De tels signaux sont connus dans l'art antérieur.

25

Un autre objet de la présente invention est également relatif à un vecteur comportant un tel acide nucléique recombinant. Un tel vecteur peut notamment être un dérivé du vecteur Ti.

30

Les acides nucléiques recombinants ou vecteurs de l'invention peuvent être introduits dans les plantes par toute technique connue de l'homme du

métier, et notamment par des techniques chimiques, physiques ou biologiques. Les techniques chimiques impliquent par exemple l'emploi d'agents transfectants facilitant la pénétration cellulaire. Les techniques physiques sont par exemple l'électroporation, le bombardement, les "gene guns", etc. Une technique
5 biologique bien connue et particulièrement efficace consiste à utiliser des infiltrations sous vide ou co-culture, vecteurs viraux ou, préférentiellement, *Agrobacterium tumefaciens*, qui permet d'introduire du matériel génétique dans les cellules de plantes au moyen du plasmide Ti. Ces techniques sont bien connues de l'homme du métier. Après transformation, les cellules de plantes
10 contenant effectivement l'acide nucléique selon l'invention sont sélectionnées. Ces cellules peuvent alors être maintenues en culture, éventuellement multipliées en culture, et utilisées directement pour la production d'acides gras ramifiés (cultures en batch, fed batch, etc.). Ces cellules peuvent également être stockées en vue d'une utilisation ultérieure. Ces cellules peuvent également être
15 utilisées pour régénérer des plantes transgéniques, selon les techniques classiques de la biologie végétale.

Un autre objet de l'invention porte donc sur un procédé de préparation d'une plante transgénique capable de produire des acides gras ramifiés,
20 comprenant l'introduction d'un acide nucléique recombinant tel que défini ci-avant dans une cellule ou partie de plante et la régénération, à partir de ces cellules ou parties de plantes d'une plante transgénique. Avantageusement, l'introduction est réalisée en utilisant *Agrobacterium*. Dans un mode particulier, l'introduction est réalisée sur des cellules de plantes ou des disques foliaires. La
25 régénération est effectuée par toute technique connue de l'homme du métier.

Un autre objet de l'invention porte sur une plante transgénique dont les cellules contiennent un acide nucléique recombinant tel que décrit ci-dessus et codant pour les enzymes permettant d'induire ou de stimuler la ramification post-synthèse des acides gras produits par ladite cellule de plante, ou des séquences
30 permettant d'induire ou de stimuler l'incorporation dans la chaîne aliphatique d'acide gras en cours d'élongation, de groupements ramifiés.

Les plantes transgéniques de l'invention contiennent l'acide nucléique recombinant intégré de façon stable dans leur génome, tant dans celui des cellules germinales que celui des cellules somatiques.

L'invention concerne également tout matériel végétal issu d'une telle
5 plante, et notamment les graines.

L'invention est également relative à un procédé de production d'acides gras ramifiés par culture d'une cellule telle que définie ci-avant et récupération des acides gras produits.

L'invention concerne également un procédé de production d'acides gras
10 ramifiés par culture cellulaire d'une cellule de plante comprenant :

- la culture de ces cellules dans un milieu approprié à leur croissance,
- l'extraction et la purification des acides gras ramifiés à partir de la biomasse cellulaire, et notamment à partir de ces cellules ou du surnageant de ladite culture.

L'invention concerne en outre un procédé de préparation d'acides gras
15 ramifiés par extraction à partir d'une plante transgénique dont les cellules contiennent un acide nucléique recombinant tel que défini ci-dessus, selon lequel lesdits acides gras sont récupérés à partir de toute partie de ladite plante, et notamment des graines de ladite plante.

L'invention concerne un procédé de préparation d'acides gras ramifiés à
20 partir d'une plante transgénique dont les cellules contiennent un acide nucléique recombinant comprenant :

- la culture en champs desdites plantes transgéniques ;
- la récupération des graines desdites plantes ;
- 25 - l'extraction des acides gras à partir de ces graines.

L'invention concerne plus généralement l'utilisation d'une plante transgénique régénérée à partir d'une cellule telle que définie ci-avant, pour la production d'acides gras ramifiés.

L'invention concerne également l'utilisation d'une plante ou partie d'une
30 plante transgénique dont au moins certaines des cellules comprennent un acide

nucléique recombinant tel que défini ci-avant, pour la production d'acides gras ramifiés.

L'invention porte enfin sur des acides gras ramifiés susceptibles d'être obtenus par le procédé tel que décrit ci-avant.

5 La présente demande sera décrite plus en détails à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LÉGENDE DES FIGURES

10 Figure 1 : Schéma de la synthèse des acides gras dans le chloroplaste des cellules de plante

Figure 2 : Représentation d'un acide nucléique recombinant comprenant un gène codant pour une transférase sous contrôle du promoteur CaMV 35S (Figure 2A) ou nos (Figure 2B).

15 Figure 3 : Représentation d'un acide nucléique recombinant comprenant un gène codant pour la SAM synthase.

Figure 4 : Représentation d'un acide nucléique recombinant comprenant un gène codant pour la malonyl-CoA décarboxylase.

20 EXEMPLE A : CONSTRUCTION D'UNE CELLULE DE PLANTE GENETIQUEMENT MODIFIEE CAPABLE DE PRODUIRE DES ACIDES GRAS RAMIFIES PAR ALKYLATION POST-ELONGATION

Cet exemple illustre la construction de plantes génétiquement modifiées capables de produire des acides gras ramifiés par alkylation post-élongation, plus particulièrement par méthylation post-élongation. En particulier, cet exemple décrit l'insertion par génie génétique dans le génome de la plante d'un gène ou
25 d'un ensemble de gènes codant pour :

. d'une part, une ou des transférases, par exemple des méthylases ou des méthyltransférases (de type Cyclopropane Fatty Acide synthase i.e. CFA synthase, par exemple) capable de catalyser l'addition des groupements méthyles (ou autres alkyls : éthyle, propyl, isopropyl...) sur les doubles liaisons
30 d'acides gras insaturés; et,

. d'autre part, d'un ou plusieurs gènes permettant d'augmenter le pool de groupements donneurs de méthyle (S-Adénosyl Méthionine i.e. SAM), notamment du gène codant pour la S-Adénosyl Méthionine synthétase (SAM synthétase).

- 5 La construction de ces plantes transgéniques selon l'invention est effectuée selon les étapes suivantes.

ETAPE 1 : MATÉRIEL VÉGÉTAL UTILISÉ.

- 10 Les plantes modèles de tabac de type SR1 (Horsch et al., 1985 Science, **22**, 1229-1231) ou BY2 (Nagata et al., 1992 Int. Rev. Of Cytol., **132**, 1-30) sont utilisées, dans un premier temps, pour réaliser les expérimentations. En effet, ces deux espèces modèles sont facilement transformables par *Agrobacterium tumefaciens* (Van Lijsebettens et al., 1986, J. Mol. Biol., **188**, 129-145 ; Shaul et al. 1986; Shaul et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 4868-4872) et
15 permettent la régénération de nouvelles plantes. Toutes plantes oléagineuses telles que colza, tournesol, arachide, soja, maïs, etc. peuvent bien entendu être utilisée de la même manière.

ETAPE 2 : CONSTRUCTIONS GÉNIQUES.

- 20 La transformation génétique consiste à introduire un acide nucléique recombinant comprenant une cassette d'expression comprenant le gène à transférer, le promoteur d'expression de ce gène qui pourra permettre une expression constitutive, spatiale ou temporelle, et une région 3' de terminaison de la transcription. Dans ce qui suit sont décrits les différents éléments
25 génétiques utilisés et la construction des acides nucléiques recombinants correspondants (Figures 2 et 3).

2.1. Sélection et isolement des acides nucléiques codant pour les enzymes.

- 30 Dans cet exemple sont utilisées des acides nucléiques codant pour des méthylases ou des méthyltransférase issue d'organismes procaryotes ou eucaryotes et dont les séquences codantes sont des analogues de la séquence

codante de la Cyclopropane Fatty Acide Synthase décrite par Wang et al. (1992 Biochemistry, **31**, 11020-11028). Plus particulièrement, un acide nucléique codant pour la Cyclopropane Fatty Acide Synthase est isolé et sa séquence vérifiée.

5 Par ailleurs, pour améliorer l'efficacité du procédé, dans un mode de réalisation particulier, un deuxième acide nucléique peut être utilisé, codant pour la SAM synthétase dont la séquence nucléotidique est décrite par Peleman et al. (1989 Plant Cell, **1**, 81-93).

2.2. Sélection des régions promotrices

10 Pour la construction des acides nucléiques recombinants, différents types de promoteurs peuvent être utilisés, et en particulier tout promoteur fonctionnel dans les plantes et permettant le contrôle de l'expression des gènes.

Dans cet exemple, les promoteurs utilisés sont le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur et le promoteur du gène de la nopaline synthase
15 (nos). La structure de ces promoteurs a été décrite par exemple par Benfey et Chua (1990, Science, **250** 959-966).

2.3. Sélection des régions terminatrices de la transcription.

Dans cet exemple, les régions terminatrices de la transcription utilisées proviennent soit directement du gène utilisé (Figure 3), soit des gènes de la
20 nopaline synthase (nos) et de l'octopine synthase (ocs).

2.4. Construction des acides nucléiques recombinants (vecteurs).

Pour construire les acides nucléiques recombinants permettant d'introduire les éléments ci-dessus dans les cellules de plantes, ces éléments génétiques sont tout d'abord isolés et sous clonés dans des vecteurs de clonage
25 de type pBR322 et pUC, qui portent des marqueurs permettant la sélection des transformants qui procurent une résistance à des agents cytotoxiques tels que antibiotiques, toxines, etc. Les cassettes d'expression sont ensuite introduites dans des vecteurs binaires contenant les séquences nécessaires à la transformation des plantes, en particulier, le vecteur T-DNA. Ce vecteur est
30 utilisé pour la transformation des plantes et la structure des vecteurs contenant les séquences spécifiques de reconnaissance (RB et LB) a été largement décrite

dans la littérature (Livre de Hoekema, the binary Plant Vector Systems, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, 1985. Molecular genetics of the Bacteria-Plant Interaction, Puhler A. Ed., Springer-Verlag, NY, 1983. Plant Genetic Transformation and Gene expression : A Laboratory Manual Draper J.,
 5 Scott R., Armitage P., et Walden R. Eds, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988. Kahl G. et Weising K., (1993) Genetic engineering of plant cells. Dans Biotechnology : Genetics Fundamentals and genetic Engineering. Rehm H.J., Reed G., Pühler A. et Stadler P. Eds, VCH Publishers Inc., New York (USA) Vol 2, pp 547-659).

10 La structure des acides nucléiques recombinants ainsi préparés est représentée sur les Figures 2 et 3.

ETAPE 3 : TRANSFORMATION DU VÉGÉTAL

Dans un premier temps, des protoplastes, des cellules végétales, des
 15 tissus ou des plantes de tabac sont transformées génétiquement par les acides nucléiques recombinants décrits ci-avant, par utilisation de méthodes de transfert indirect à l'aide d'un vecteur tel que les agrobactéries (par exemple *Agrobacterium tumefaciens*: C58C1Rif : pGV2260; Deblaere et al., 1985) ou en utilisant des méthodes de transformation directe (électroporation, bombardement
 20 de particules, infiltration sous vide, etc., (Kahl et Weising, 1993).

Dans le cas d'utilisation de transfert de gène indirect, les agrobactéries contiennent un plasmide possédant les régions vir (plasmide Ti désarmé) nécessaires au transfert du T-DNA dans les cellules végétales.

Dans une première étape facultative, les cellules sont transformées par un
 25 acide nucléique recombinant (figure 3) codant pour la SAM synthétase. Les transformants possédant un fort potentiel méthylant sont alors sélectionnés.

Ces lignées, ou des cellules non encore transformées, sont ensuite transformées génétiquement en vue d'insérer dans leur génome un acide
 30 nucléique recombinant (figure 2) contenant le gène codant pour la CFA synthase décrite précédemment.

Le protocole utilisé pour réaliser ces transformations a été décrit par Van Lijsebettens et al. (1986 J. Mol. Biol., 188, 129-145) ou répertorié dans la littérature (Plant Genetic Transformation and Gene Expression : A Laboratory Manual. Draper J., Scott R., Amritage P., et Walden R. Eds, Blackwell Scientific Publications; Oxford, 1988 ; Kahl G. Et Weiding K. (1993) Genetic engineering of plant cells. Dans Biotechnology: Genetics Fundamentals and genetic Engineering. Rehm H.J., Reed G., Pühler A. et Stadler P. Eds, VCH Publishers Inc., New York (USA) Vol. 2, pp547-659).

10 ETAPE 4 : CULTURE ET SÉLECTION DES PLANTES TRANSFORMÉES.

Les cellules végétales transformées par les vecteurs contenant les constructions précédemment décrites sont ensuite régénérées à partir de cellules isolées, de cals ou de disques foliaires en utilisant les techniques habituelles de cultures de plantes (Plant Cell Culture : A practical Approach. 15 Dixon R.A. ed., IRL Press, Oxford, Washington DC., 1985). Les cellules et plantes transformées sont mises en culture suivant les procédures habituelles et décrites dans la littérature. La sélection des cellules et plantes transformées s'effectue lors de leur culture, sur milieu sélectif contenant un antibiotique ou toxine spécifiques de la cassette introduite.

20

ETAPE 5 : ANALYSE DES TRANSFORMANTS

Les transformants ainsi produits sont ensuite analysés à plusieurs niveaux:

- a) - Analyse directe confirmant la présence du gène dans la cellule végétale 25 ou la plante, réalisée soit par Southern blot ou analyses PCR nécessitant des extractions d'ADN génomique. (Protocole décrit dans le Sambrook et/ou le Current Protocol).

Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. dans Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Irwin N., Ford N., Nolan C. et Ferguson M. eds, Cold Spring 30 Harbor Laboratory Press. 1989.

Current protocols in Molecular Biology. Ausubel F. M. Brent R. Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. et Struhl K. eds , Current Protocols Inc Wiley, Massachusetts..., Vol. 1: Molecular Biology - Techniques. 1994 t Vol. 2: Molecular Biology - Laboratory. 1994.

5

b) - Analyse du produit du gène i.e. ARNm par Northern blot et confirmant la transcription du gène (Protocole décrit dans le Sambrook et/ou le Current Protocol cités ci-dessus).

10

c) - Analyse de la protéine synthétisée, l'enzyme (confirmant la traduction du gène en protéine) et permettant de s'assurer de la fonctionnalité de celle-ci (dosage enzymatique immunoblot, Western blot).

15

Le dosage de la SAM synthétase et du pool SAM dans les cellules est réalisé plus particulièrement en suivant le protocole décrit par Mathur et Sachar (1981 FEBS Lett., 287, 113-117).

Le dosage de la CFA synthase dans les cellules et plantes de tabac est réalisé suivant le protocole décrit par Taylor et Cronan (1979 Biochemistry, 18, 3292-3300).

20

d) - L'analyse et l'identification des triglycérides synthétisés sont réalisées par utilisation de techniques chromatographiques de type HPLC, GC-MS ou par RMN après extraction en utilisant les protocoles décrit dans la littérature.

25

Ces expériences permettent de vérifier que les acides nucléiques recombinants sont fonctionnels, qu'ils peuvent être introduits dans les cellules de plantes, que lesdites cellules peuvent être régénérées, et que ces cellules produisent effectivement des acides gras ramifiés. Ces acides peuvent par la suite être récupérés directement dans les graines des plantes correspondantes, par les techniques d'extraction connues.

EXEMPLE B : CONSTRUCTION D'UNE CELLULE DE PLANTE GENETIQUEMENT MODIFIEE CAPABLE DE PRODUIRE DES ACIDES GRAS RAMIFIES (MULTIBRANCHES) AU COURS DE L'ELONGATION

5 Cet exemple illustre la construction de plantes génétiquement modifiées capables de produire des acides gras ramifiés multibranchés. En particulier, cet exemple décrit l'insertion par génie génétique dans le génome de la plante d'un gène ou d'un ensemble de gènes conduisant la plante à utiliser un Acyl-CoA non linéaire ayant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 3 (le méthylmalonyl
10 CoA par exemple) à la place du malonyl CoA afin d'obtenir des acides gras ramifiés dits multibranchés tels que l'acide 2, 4, 6, 8-tétraméthyl décanoïque. La synthèse des acides gras se produisant dans les chloroplastes, l'acide nucléique recombinant inséré comporte avantageusement un gène codant pour une malonyl-CoA décarboxylase (E.C. N° 4.1.1.9) de telle sorte que cette enzyme
15 soit active au niveau chloroplastique ou bien à un autre niveau de la cellule. Ceci est obtenu soit par introduction de l'acide recombinant dans les chloroplastes, soit par insertion d'un peptide de transit permettant l'adressage de la protéine dans ce compartiment.

La construction de ces plantes transgéniques selon l'invention est
20 effectuée selon les étapes suivantes (Figure 4).

ETAPE 1 : MATÉRIEL VÉGÉTAL UTILISÉ.

Le matériel végétal utilisé est identique à celui décrit dans l'exemple A.

25 **ETAPE 2 : CONSTRUCTIONS GÉNIQUES.**

La transformation génétique consiste à introduire une cassette d'expression comprenant le gène à transférer, le promoteur d'expression de ce gène qui pourra permettre une expression constitutive, spatiale ou temporelle et une séquence nucléotidique supplémentaire codant pour un peptide de transit
30 permettant l'adressage de la protéine dans un compartiment cellulaire où elle sera active.

2.1. Sélection et isolement des acides nucléiques codant pour les enzymes.

Utilisation du gène codant pour la malonyl-CoA décarboxylase dont la séquence nucléotidique est décrite par Kolattukudy et al. (1987) ou toutes autres
5 séquences nucléotidiques analogues provenant d'autres organismes ou microorganismes procaryotes ou eucaryotes.

Kolattukudy P.E. Rogers L.M., Poulouse A.J., Jang S.H., Kim Y.S., Cheesbrough T.M. et Liggitt D.H. (1987) Developmental pattern of the expression of malonyl-CoA decarboxylase gene and the production of unique
10 lipids in the goose uropygial glands. Arch. Biochem. Biophys., **256**, 446-454.

Fernandese N.D. et Kolattukudy P.E. (1996) Cloning, sequencing and characterization of a fatty acid synthase-encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. Gene, **170**, 95-99.

Dans certains cas, des composants de la synthèse d'acides gras sont
15 localisés dans les chloroplastes ou autres organelles. Dans notre cas, l'enzyme synthétisée : malonyl-CoA décarboxylase, doit être transportée dans les chloroplastes pour être active. Il faudra ajouter dans nos constructions géniques une séquence d'ADN codant pour un peptide de transit opérationnel et reconnu
20 par la plante réceptrice. Ces peptides de transit sont en général des séquences leader qui devront être combinées à la séquence nucléotidique du gène associé à un promoteur spécifique. Ces séquences "signal" peuvent être représentées par n'importe quelles autres séquences nucléotidiques dérivées de celle d'un gène qui s'exprime dans le cytoplasme avant d'atteindre son compartiment réactionnel approprié. L'ADN de ces peptides de transit peuvent provenir
25 d'autres plantes. Cela peut être, par exemple, le peptide de transit de la petite sous unité de la RUBISCO du soja ou les séquences codant pour les 6 ou 12 acides aminés terminaux de la petite sous unité mature de la RUBISCO de pois et mentionnés dans le brevet de Calgene WO 94/29467 (Schéma de type 4).

2.2. Sélection des régions promotrices

30 Dans cet exemple, les promoteurs utilisés sont le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur et le promoteur du gène de la nopaline synthase



(nos). La structure de ces promoteurs a été décrite par exemple par Benfey et Chua (1990, Science, **250** 959-966).

2.3. Sélection des régions terminatrices de la transcription

Dans cet exemple, les régions terminatrices de la transcription utilisées
5 proviennent des gènes de la nopaline synthase (nos) et de l'octopine synthase (ocs) (Figure 4).

2.4. Construction des acides nucléiques recombinants (vecteurs)

Pour construire les acides nucléiques recombinant permettant d'introduire
les éléments ci-dessus dans les cellules de plantes, ces éléments génétiques
10 sont tout d'abord isolés et sous clonés dans des vecteurs de clonage de type pBR322 et pUC, qui portent des marqueurs permettant la sélection des transformants qui procurent une résistance à des agents cytotoxiques tels que antibiotiques, toxines, etc. Les cassettes d'expression sont ensuite introduites dans des vecteurs binaires contenant les séquences nécessaires à la
15 transformation des plantes, en particulier, le vecteur T-DNA. Ce vecteur est utilisé pour la transformation des plantes et la structure des vecteurs contenant les séquences spécifiques de reconnaissance (RB et LB) a été largement décrite dans la littérature (Livre de Hoekema, the binary Plant Vector Systems, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, 1985. Molecular genetics of the
20 Bacteria-Plant Interaction, Puhler A. Ed., Springer-Verlag, NY, 1983. Plant Genetic Transformation and Gene expression : A Laboratory Manual Draper J., Scott R., Armitage P., et Walden R. Eds, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988. Kahl G. et Weising K., (1993) Genetic engineering of plant cells. Dans Biotechnology : Genetics Fundamentals and genetic Engineering. Rehm
25 H.J., Reed G., Pühler A. et Stadler P. Eds, VCH Publishers Inc., New York (USA) Vol 2, pp 547-659).

La structure des acides nucléiques recombinants ainsi préparés est représentée sur la Figure 4.

30 ETAPE 3 : TRANSFORMATION DU VÉGÉTAL

Dans un premier temps, des protoplastes, des cellules végétales, des tissus ou des plantes de tabac sont transformées génétiquement par les acides nucléiques recombinants décrits ci-avant, par utilisation de méthodes de transfert indirect à l'aide d'un vecteur tel que les agrobactéries (par exemple

5 *Agrobacterium tumefaciens*: C58C1Rif : pGV2260; Deblaere et al., 1985) ou en utilisant des méthodes de transformation directe (électroporation, bombardement de particules, infiltration sous vide, etc., (Kahl et Weising, 1993).

Dans le cas d'utilisation de transfert de gène indirect, les agrobactéries contiennent un plasmide possédant les régions vir (plasmide Ti désarmé)

10 nécessaires au transfert du T-DNA dans les cellules végétales.

Les cellules sont transformées génétiquement en vue d'insérer dans leur génome un acide nucléique recombinant (figure 4) contenant le gène codant pour la malonyl-CoA décarboxylase décrite précédemment.

Le protocole utilisé pour réaliser ces transformations a été décrit par Van

15 Lijsebettens et al. (1986 J. Mol. Biol., **188**, 129-145) ou répertorié dans la littérature (Plant Genetic Transformation and Gene Expression : A Laboratory Manual. Draper J., Scott R., Amritage P., et Walden R. Eds, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988 ; Kahl G. Et Weiding K. (1993) Genetic engineering of plant cells. Dans Biotechnology: Genetics Fundamentals and genetic

20 Engineering. Rehm H.J., Reed G., Pühler A. et Stadler P. Eds, VCH Publishers Inc., New York (USA) Vol. 2, pp547-659).

ETAPE 4 : CULTURE ET SÉLECTION DES PLANTES TRANSFORMÉES.

Les cellules végétales transformées par les vecteurs contenant les

25 constructions précédemment décrites sont ensuite régénérées à partir de cellules isolées, de cals ou de disques foliaires en utilisant les techniques habituelles de cultures de plantes (Plant Cell Culture : A practical Approach. Dixon R.A. ed., IRL Press, Oxford, Washington DC., 1985). Les cellules et plantes transformées sont mises en culture suivant les procédures habituelles et

30 décrites dans la littérature. La sélection des cellules et plantes transformées



s'effectue lors de leur culture, sur milieu sélectif contenant un antibiotique ou toxine spécifiques de la cassette introduite.

ÉTAPE 5 : ANALYSE DES TRANSFORMANTS

- 5 Les transformants ainsi produits sont ensuite analysés à plusieurs niveaux:
 - a) - Analyse directe confirmant la présence du gène dans la cellule végétale ou la plante, réalisée soit par Southern blot ou analyses PCR nécessitant des extractions d'ADN génomique selon un Protocole décrit dans :
 - 10 - Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. dans Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Irwin N., Ford N., Nolan C. et Ferguson M. eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 ou,
 - Current protocols in Molecular Biology. Ausubel F. M. Brent R. Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. et Struhl K. eds , Current Protocols Inc Wiley, Massachusetts..., Vol. 1: Molecular Biology - Techniques. 1994 et Vol. 15 2: Molecular Biology - Laboratory. 1994.
 - b) - Analyse du produit du gène i.e. ARNm par Northern blot et confirmant la transcription du gène (Protocole décrit dans le Sambrook et/ou le Current Protocole cités ci-dessus).
 - 20 c) - Analyse de la protéine synthétisée, l'enzyme (confirmant la traduction du gène en protéine) et permettant de s'assurer de la fonctionnalité de celle-ci (dosage enzymatique immunoblot, Western blot).
 - d) Dosage de la Malonyl-CoA décarboxylase suivant le protocole décrit par Kolattuduky et al. (1987) : Developmental pattern of the expression of Malonyl- 25 CoA decarboxylase gene and the production of unique lipids in the goose uropygial glands. Arch. Biochem. Biophys., **256**, 446-454.
 - e) - L'analyse et l'identification des triglycérides synthétisés sont réalisées par utilisation de techniques chromatographiques de type HPLC, GC-MS ou par RMN après extraction en utilisant les protocoles décrit dans la littérature.
- 30 Ces expériences permettent de vérifier que les acides nucléiques recombinants sont fonctionnels, qu'ils peuvent être introduits dans les cellules de

plantes, que lesdites cellules peuvent être régénérées, et que ces cellules produisent effectivement des acides gras ramifiés. Ces acides peuvent par la suite être récupérés directement dans les graines des plantes correspondantes, par les techniques d'extraction connues.

REVENDICATIONS

1. Cellule de plante comprenant un acide nucléique recombinant codant pour un produit induisant ou stimulant dans ladite cellule, la synthèse d'acides gras ramifiés.
- 5 2. Cellule de plante selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour un produit permettant d'induire ou de stimuler la ramification post-synthèse des acides gras produits par ladite cellule.
3. Cellule de plante selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme permettant le transfert d'un
10 ou plusieurs groupements alkyl sur la ou les doubles liaisons des acides gras insaturés.
4. Cellule de plante selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une méthyle transférase.
5. Cellule de plante selon la revendication 3, caractérisée en ce que
15 l'acide nucléique recombinant code pour une cyclopropane fatty acid synthase.
6. Cellule de plante selon la revendication 3, 4 ou 5, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, un acide nucléique recombinant codant pour la SAM synthétase.
7. Cellule de plante selon la revendication 1, caractérisée en ce que
20 l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme permettant de forcer ladite cellule de plante à utiliser un substrat comportant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 3 pour la synthèse de la chaîne aliphatique.
8. Cellule de plante selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme capable de forcer la plante
25 à utiliser un acyl-CoA non linéaire, tel que notamment le méthylmalonyl CoA.
9. Cellule de plante selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une malonyl CoA décarboxylase.
10. Plante transgénique caractérisée en ce qu'elle contient au moins une cellule selon l'une quelconque des revendication 1 à 9.
- 30 11. Acide nucléique recombinant caractérisé en ce qu'il contient :

- une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme permettant le transfert d'un ou plusieurs groupements alkyls sur la ou les doubles liaisons des acides gras insaturés, ou pour une enzyme permettant de forcer une cellule de plante à utiliser un substrat comportant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 3 comme substrat pour la synthèse de la chaîne aliphatique ;

- un promoteur contrôlant l'expression dudit acide nucléique dans une cellule de plante,

- une région en 3' de terminaison de la transcription.

12. Acide nucléique recombinant caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une méthyl transférase.

13. Acide nucléique recombinant selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une cyclopropane fatty acid synthase.

14. Acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que sa séquence comprend en outre un acide nucléique codant pour la SAM synthétase.

15. Acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une malonyl-CoA décarboxylase.

20 16. Vecteur comprenant un acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

17. Procédé de production d'acides gras ramifiés par culture cellulaire d'une cellule de plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, et comprenant :

25 - la culture de ces cellules dans un milieu approprié à leur croissance,
- l'extraction et la purification des acides gras ramifiés à partir des cellules ou du surnageant de ladite culture.

18. Procédé de préparation d'acides gras ramifiés à partir d'une plante transgénique dont les cellules contiennent un acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 - la culture en champs desdites plantes transgéniques ;



- la récupération des graines desdites plantes ;
- l'extraction des acides gras à partir de ces graines.

5 **19.** Utilisation d'une plante transgénique selon la revendication 10, régénérée à partir d'une cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour la production d'acides gras ramifiés.

20. Utilisation d'une plante ou partie d'une plante transgénique dont certaines cellules au moins comprennent un acide nucléique recombinant selon la revendication 11, pour la production d'acides gras ramifiés.

10 **21.** Acides gras ramifiés susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'une quelconque des revendications 17 ou 18.

22. Procédé de préparation d'une plante transgénique capable de produire des acides gras ramifiés, comprenant l'introduction d'un acide nucléique recombinant tel que défini dans la revendication 11 dans une cellule ou partie de plante et la régénération, à partir de ces cellules ou parties de plantes d'une
15 plante transgénique.

- une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme permettant le transfert d'un ou plusieurs groupements alkyls sur la ou les doubles liaisons des acides gras insaturés, ou pour une enzyme permettant de forcer une cellule de plante à utiliser un substrat comportant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 3 comme substrat pour la synthèse de la chaîne aliphatique ;
- un promoteur contrôlant l'expression dudit acide nucléique dans une cellule de plante,
- une région en 3' de terminaison de la transcription.

12. Acide nucléique recombinant selon la revendication 11, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique code pour une méthyl transférase.

13. Acide nucléique recombinant selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une cyclopropane fatty acid synthase.

14. Acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que sa séquence comprend en outre un acide nucléique codant pour la SAM synthétase.

15. Acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une malonyl-CoA décarboxylase.

16. Vecteur comprenant un acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

17. Procédé de production d'acides gras ramifiés par culture cellulaire d'une cellule de plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, et comprenant :

- la culture de ces cellules dans un milieu approprié à leur croissance,
- l'extraction et la purification des acides gras ramifiés à partir des cellules ou du surnageant de ladite culture.

18. Procédé de préparation d'acides gras ramifiés à partir d'une plante transgénique dont les cellules contiennent un acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la culture en champs desdites plantes transgéniques ;

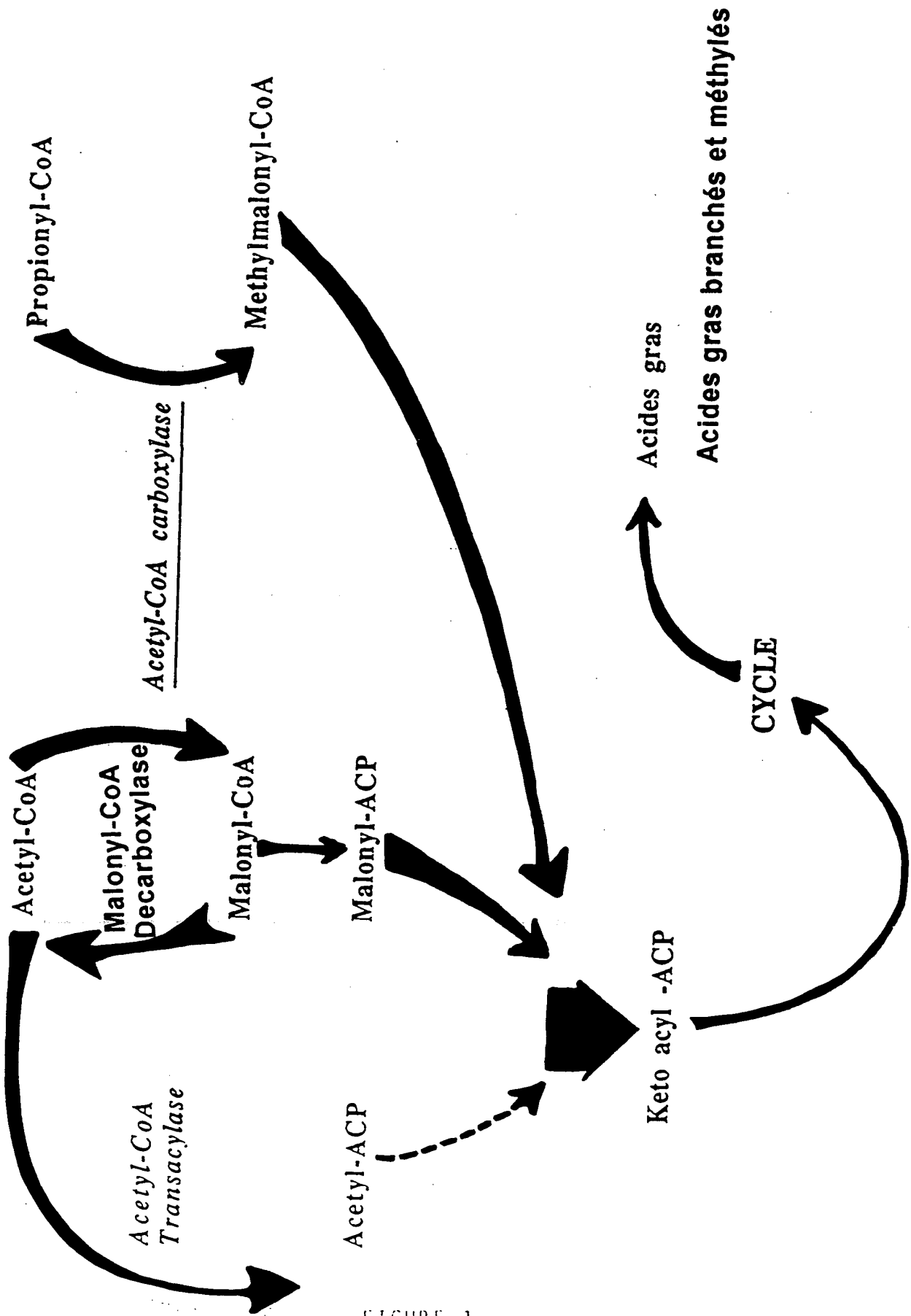


FIGURE 1

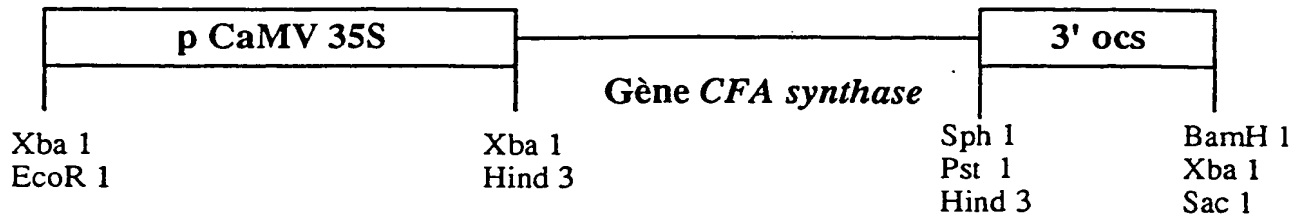


FIGURE 2A

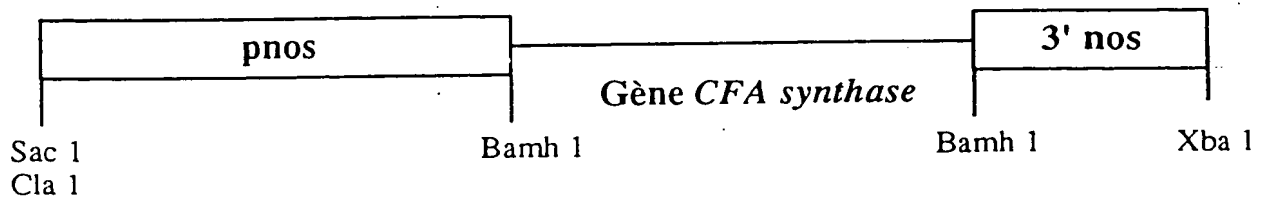


FIGURE 2B

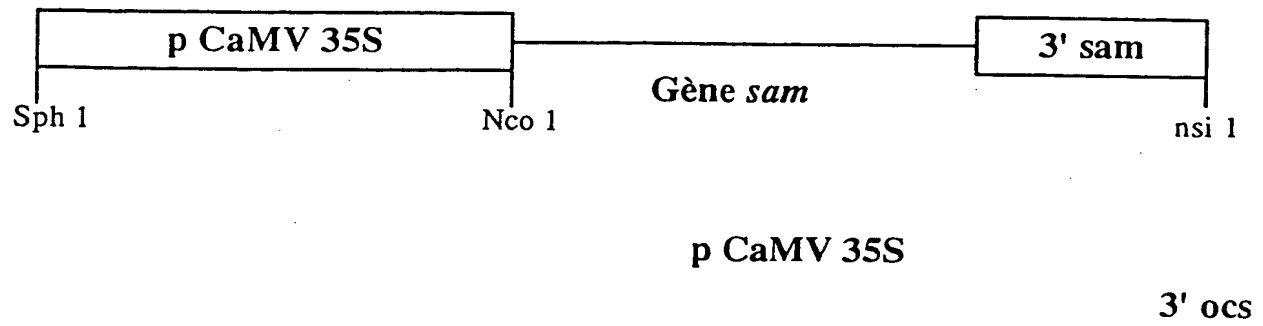


FIGURE 3

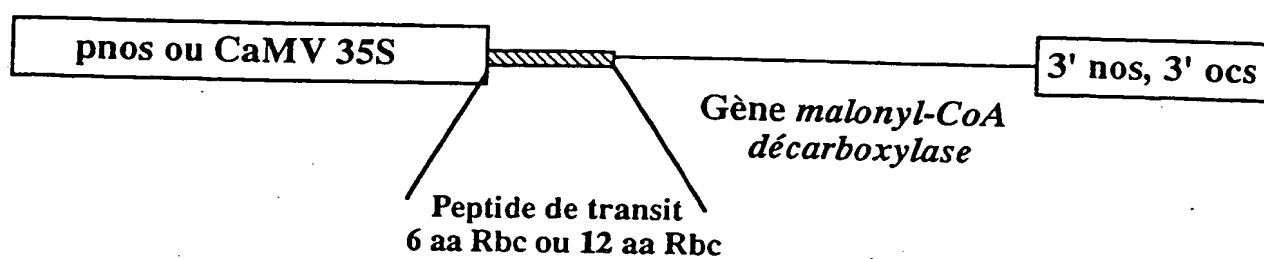


FIGURE 4

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production d'acides gras ramifiés, caractérisé en ce que lesdits acides gras ramifiés sont produits à partir d'une cellule de plante ou d'une
5 plante ou partie d'une plante comprenant au moins une cellule de plante, ladite cellule de plante comprenant dans son génome un acide nucléique recombinant codant pour un produit induisant ou stimulant la synthèse d'acide(s) gras ramifié(s).

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d'extraction des acides gras ramifiés.

10 3. Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour un produit permettant d'induire ou de stimuler la ramification post-synthèse des acides gras produits par ladite cellule.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme permettant le transfert d'un ou
15 plusieurs groupements alkyl sur la ou les doubles liaisons des acides gras insaturés.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une méthyle transférase.

6. Procédé selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une cyclopropane fatty acid synthase.

20 7. Procédé selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que la cellule végétale comprend en outre, un acide nucléique recombinant codant pour la SAM synthétase.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme permettant de forcer ladite
25 cellule de plante à utiliser un substrat comportant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 3 pour la synthèse de la chaîne aliphatique.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une enzyme capable de forcer la plante à utiliser un acyl-CoA non linéaire, tel que notamment le méthylmalonyl CoA.

30 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant code pour une malonyl CoA décarboxylase.

11. Acide nucléique recombinant caractérisé en ce qu'il comprend:

- un acide nucléique codant pour un produit induisant ou stimulant la synthèse d'acide(s) gras ramifié(s),

- un promoteur contrôlant l'expression dudit acide nucléique, et capable de causer une expression de cet acide nucléique localisée à certains tissus végétaux ou certaines parties végétales, et,

- une région 3' de terminaison de la transcription.

5 **12.** Acide nucléique selon la revendication 11, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur capable de causer une expression de l'acide nucléique localisée dans la graine d'une plante.

13. Acide nucléique recombinant comprenant:

10 - un acide nucléique codant pour une méthyl-transférase capable de catalyser le transfert d'un groupement méthyle vers la chaîne aliphatique d'un acide gras insaturé,

- un promoteur fonctionnel dans les cellules végétales contrôlant l'expression dudit acide nucléique, et,

- une région 3' de terminaison de la transcription.

15 **14.** Acide nucléique recombinant comprenant:

- un acide nucléique codant pour une enzyme permettant de forcer une cellule de plante à utiliser un substrat comportant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 3 comme substrat pour la synthèse de la chaîne aliphatique, notamment pour une malonyl CoA décarboxylase,

20 - un promoteur fonctionnel dans les cellules végétales contrôlant l'expression dudit acide nucléique, et,

- une région 3' de terminaison de la transcription.

25 **15.** Acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que sa séquence comprend en outre un acide nucléique codant pour la SAM synthétase.

16. Vecteur comprenant un acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

17. Cellule de plante comprenant un acide nucléique recombinant tel que défini dans l'une des revendications 11 à 15 ou un vecteur selon la revendication 16.

30 **18.** Cellule de plante selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de plante oléagineuse, choisie de préférence parmi le colza, le tournesol, l'arachide, le soja et le maïs.

19. Plante transgénique caractérisée en ce qu'elle contient au moins une cellule selon la revendication 17 ou 18.

20. Plante transgénique caractérisée en ce ses cellules contiennent un acide nucléique selon les revendications 11 à 15 ou un vecteur selon la revendication 16.

21. Procédé de production d'acides gras ramifiés par culture cellulaire d'une cellule de plante selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, et comprenant :

- la culture de ces cellules dans un milieu approprié à leur croissance,
- l'extraction et la purification des acides gras ramifiés à partir des cellules ou du surnageant de ladite culture.

22. Procédé de préparation d'acides gras ramifiés à partir d'une plante transgénique dont les cellules contiennent un acide nucléique recombinant selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la culture en champs desdites plantes transgéniques ;
- la récupération des graines desdites plantes ;
- l'extraction des acides gras à partir de ces graines.

23. Utilisation d'une plante transgénique selon la revendication 19 ou 20, régénérée à partir d'une cellule selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, pour la production d'acides gras ramifiés.

24. Utilisation d'une plante ou partie d'une plante transgénique dont certaines cellules au moins comprennent un acide nucléique recombinant selon la revendication 11, pour la production d'acides gras ramifiés.

25. Acides gras ramifiés obtenus par le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 10, 21 ou 22.

26. Utilisation d'un ester d'acide gras ramifié susceptible d'être obtenu par le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 10, 21 ou 22 pour la préparation d'une composition lubrifiante.

27. Procédé de préparation d'une plante transgénique capable de produire des acides gras ramifiés, comprenant l'introduction d'un acide nucléique recombinant tel que défini dans la revendication 11 dans une cellule ou partie de plante et la régénération, à partir de ces cellules ou parties de plantes d'une plante transgénique.

THIS PAGE BLANK (USPTO)